

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.06.027

光合细菌生物制氢技术研究进展*

张全国 王毅

(河南农业大学农业部可再生能源新材料与装备重点实验室, 郑州 450002)

摘要: 阐述了国内外光合细菌生物制氢技术的研究进展,讨论了影响光合细菌制氢技术发展的主要因素,探索了利用生物与工程技术提高光合细菌产氢效率的有效途径和方法,指出了目前光合细菌生物制氢技术发展存在的障碍和问题,并对光合细菌生物制氢技术发展方向及趋势进行了展望。

关键词: 光合细菌 生物制氢 产氢工艺 光合反应器 研究进展

中图分类号: TK6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2013)06-0156-06

Research Progress of Hydrogen Production Technology with Photosynthetic Bacteria

Zhang Quanguo Wang Yi

(Key Laboratory of New Materials and Facilities for Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The current research progress of biological hydrogen production technology with photosynthetic bacteria was presented. The main factors that influenced the development of hydrogen production technology with photosynthetic bacterial were discussed. The improving hydrogen production efficiency with biological and engineering technology were analyzed. The obstacles and problems of the biological hydrogen production technology with photosynthetic bacteria were indicated. The development trends of hydrogen production with photosynthetic bacteria were also previewed.

Key words: Photosynthetic bacterial Biohydrogen production Hydrogen production technology Photo-bioreactor Research progress

引言

随着化石能源不断消耗以及环境污染问题的日趋严重,寻找可再生的、环境友好的能源已经成为能源研究的主要方向。氢燃烧时只生成水,不产生任何污染物,且具有能量密度高、热转化效率高、输送成本低等特点而被认为是理想的替代能源。虽然制氢有物理、化学、生物等很多方法,但传统的化石燃料重整制氢及电解水制氢等技术由于存在着耗能大、原料转化率低及污染环境等问题,一直制约着氢能的大规模应用与发展。生物制氢耗能低、污染少、反应条件温和,且能将制氢与废弃物再利用相结合,

因此受到国内外众多研究者的广泛关注^[1]。光合细菌制氢与其他生物制氢方法相比具有能量利用率高,能将产氢与光能利用、有机物的去除有机地耦合在一起的优点,是最具发展潜力的生物制氢方式之一^[2-3]。

目前关于光合细菌产氢的研究,国内外主要是集中在高产氢活性菌株的筛选,产氢工艺条件的优化,影响光合产氢的主要因素探索以及利用可再生能源多原料产氢等方面。由于光合细菌产氢代谢途径多样,底物代谢易受环境条件变化影响及光合产氢复杂性等原因,光合细菌生物制氢的效率依然很低,尤其是利用可再生能源及有机废弃物产氢效

收稿日期: 2013-01-16 修回日期: 2013-01-21

* 国家自然科学基金资助项目(50976029)和国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2012AA05051502)

作者简介: 张全国,教授,博士生导师,主要从事可再生能源研究, E-mail: zquanguo@163.com

率低,成本高,制约着光合细菌生物制氢技术的进一步发展^[3]。本文论述光合细菌生物制氢的主要影响因素,阐述现代生物与工程技术手段在光合生物制氢技术中的应用,分析光合生物产氢反应器研究现状及存在的问题,并就光合生物制氢技术发展的趋势和方向进行展望。

1 光合细菌生物制氢的影响因素

随着对光合细菌产氢机理的深入研究和产氢过程的了解和认识,光合细菌生物制氢已逐渐由理论研究转向获取氢能的技术研究。对产氢影响因素的分析是氢能制取过程中提高产氢量、产氢速率,设计产氢最优工艺条件,改善产氢反应器设计的基础,相关的研究主要有以下几个方面。

1.1 接种浓度及菌龄

光合细菌的接种浓度和菌龄对其产氢持续时间和产氢量都有很大的影响。一般来说生物量越高,产氢量也越高,但是过高的生物量对产氢会有负效应^[4]。张全国等研究表明接种量与氢气产量密切相关,当接种量小于200%时,随着接种量的增加,氢气产量和产氢速率逐渐增加,接种量在10%~100%时,产氢效果最好,当接种量增加到200%时,产氢速率和氢气产量反而会降低^[5]。师玉忠等在光合细菌连续制氢工艺及相关机理研究中也指出过高的菌体浓度不仅会影响细胞的营养供给和产氢原料的供应,菌体的遮光效应还会影响深层细菌光能的获取,导致负效应。不同光合细菌及同一菌种不同初期活性所具有的酶系发育程度有所不同,表现在产氢能力上的不同^[6-7],大多数学者研究认为选择处于对数生长期的菌种产氢效果最为理想。

1.2 产氢底物

产氢底物的选择及其预处理对产氢效率的影响至关重要。光合细菌制氢的核心问题是提高氢气的转化率,降低产氢成本。为了获得较低成本的产氢原料,国内外开展了对各种工业废水、生活有机废水及工农业废弃物作为产氢原料的研究,取得了显著的效果。Turkarlsan等研究了以牛奶厂的生产废水作产氢底物,发现生产废水中添加苹果酸盐后产氢效果良好^[8];Fascetti等研究了用乳酸发酵废水产氢,发现乳酸废水是一种良好的产氢底物,产氢效果良好^[9];张全国等研究了畜禽粪便污水的光合产氢能力^[10];Singh等研究了蔬菜淀粉、甘蔗汁和乳清为原料产氢的对比实验,还研究了果蔬市场废弃物产氢,结果表明果蔬废弃物产氢速率比合成培养基产氢速率提高了近3倍^[11]。Kim等研究了将发酵细菌与光合细菌混合培养,利用食品处理废水和下水

道废水为原料产氢,结果表明,此种工艺具有很大的产氢潜力。通常情况下底物只有经过预处理才能被光合细菌利用,李刚等的研究表明:在黑暗厌氧条件下预处理5~7d的牛粪最适宜作光合细菌产氢的底物^[12]。张全国等在影响天然混和红螺菌产氢因素的实验研究中也提出了光合细菌不能直接利用猪粪进行产氢,需对其进行预处理^[13]。岳建芝等利用超微粉碎技术对木质纤维素类生物质进行预处理,结果表明,经处理的超微秸秆具有良好的产氢能力^[14]。

1.3 光照

光照是光合细菌产氢的必备条件,光合产氢菌在黑暗处不产氢或仅有较低的产氢速率,光源、光照强度和光照时间对光合细菌制氢的活性影响很大^[15]。张全国等对高效光合产氢菌群的研究显示:当光照强度小于6000 lx时,随着光照强度的增大,产氢量和产氢速率逐渐增大,而当光照强度大于8000 lx或小于500 lx时,产氢量都会下降^[16]。不同光源下光合产氢菌的生长情况和产氢能力有很大的差别,且与其吸收光谱间存在着良好的相关性,当提供给光合产氢菌其吸收峰附近及吸光度高的波段时,其各方面的指标都比较理想。然而,对于同一菌株,当改变其光源的光照波段时,其生理特性就会发生明显的改变,这与张全国等在太阳光谱对光合细菌生长及产氢特性的影响研究中得出的结论是一致的。同时,Miyake等的研究也表明:同等条件下*Rspiraoides*8703菌株以氙灯和太阳能模拟器为光源时产氢能力也不相同,光照强度过高反而不利于产氢^[17]。

1.4 温度和pH值

在光合制氢过程中,环境温度和培养基的pH值均能影响产氢速率。培养基的pH值主要影响氢酶和固氮酶的活性,从而影响氢气的产量。孙琦等研究表明:pH值在4~5之间时,光合细菌基本不产氢或产氢量很小;光合细菌是典型的中性菌,最佳生长和产氢pH值在6~8之间,当pH值保持在7左右时产氢量最佳^[18]。温度对菌体的生长活性及产氢活性的影响也不容忽视,温度太高或过低都会对细菌产生不利影响,张全国等研究表明在38℃时,光合细菌实际上已经不能够再产氢了,在25~34℃时,光合细菌的产氢能力很强,34℃时达到最佳状态^[19]。

1.5 氮源种类及浓度

氮源的种类及其氮源的浓度对光合细菌产氢有很大的影响,光合细菌产氢主要是由固氮酶催化的,因而氮源对光合细菌产氢的影响主要体现在不同氮

对固氮酶活性的影响作用上。 NH_4^+ 存在能抑制固氮酶的活性,光合产氢的活性亦受到 NH_4^+ 的阻遏与抑制。国内外在固氮酶放氢机理及固氮酶活性影响因素方面已有一定的认识和了解,Postgate 提出了一个固氮酶催化产氢的模型,李季伦在验证伴随固氮酶催化还原 N_2 成 NH_3 的同时,首次提出固氮酶的双位点放 H_2 理论^[20-21]。Ludden 研究发现 NH_4^+ 不论对光合厌氧生长的菌体还是好氧生长的菌体均抑制固氮酶的生长活性^[22]。Scolnik 等发现过量 NH_4^+ 抑制光合细菌产氢是由于 NH_4^+ 阻抑了固氮酶 *nifHDK* 的转录^[23]。师玉忠等发现粪便污水中 NH_4^+ 光合产氢混合菌群的产氢也具有强烈的抑制作用,消除 NH_4^+ 对产氢有明显促进作用。Tadashi 等发现光合细菌固氮酶放氢不需严格厌氧环境,暗处光合细菌依赖于氧的固氮酶仍有一定的活性^[24]。张全国等在光合细菌产氢过程中的氮代谢实验研究中发现不同种类氮源对光合产氢混合菌群产氢的影响并不是很明显,有机氮源条件下的菌体的产氢效果好于无机氮源。此外, NH_4^+ 对光合磷酸化也有偶联作用,影响光合作用产生 ATP,过量的 NH_4^+ 直接导致细胞内 ATP 水平的下降,光合产氢过程因能量缺失而使产氢受到抑制^[25]。

2 现代生物技术手段在光合生物制氢中的应用

2.1 高效产氢菌种的筛选和分离

筛选和改造高产氢气的菌株是光合生物制氢研究的基础,尽管光合细菌对产氢条件的要求方面要优于厌氧菌,但是,仍有必要通过对光合优势高产菌株的筛选和改造来进一步提高产氢菌株的产氢能力。光合产氢菌株能从自然环境中获得,也可从人工环境中分离筛选得到,还可以通过基因工程技术和人工诱变来得到所需的基因缺陷菌株和诱变菌株。尤希凤从养殖场、食品厂等废水中分离出多株能高效利用猪粪污水产氢的光合细菌^[26]。Singh 等从 3 种水生植物中分离得到 4 株高温光合细菌,鉴定为 *Rhodospseudomonas* sp. 分别记为 BHU1 ~ BHU4,而 BHU1 和 BHU4 两菌株在印度赤道高温天气下具有很好的产氢效果^[11,27]。张全国等从养殖场、豆腐厂、污水处理厂、鱼塘等地取样,从混合菌种中分离得到 14 株纯菌种,其中通过生理鉴定和分子鉴定,得到 5 株(深红红螺菌、荚膜红假单胞菌、沼泽红假单胞菌、类球红细菌和荚膜红细菌)属于光合细菌中的产氢菌,同时还筛选得到 8 株疑似光合细菌菌株^[28]。Eui-Jin 等利用遗传技术得到了缺失 B850-800 复合物的 *R. sphaeroides* 变异菌株,其生长与野生菌株相比没有大的差别,但是产氢能力却比野生

菌株提高了 2 倍。

2.2 产氢关键酶的改造和调控

光合细菌产氢不仅仅是细胞的物质代谢过程,也是细胞的能量代谢过程,光合细菌产氢过程非常复杂,存在着多种代谢途径,氢的物质代谢和能量代谢过程有多种酶参与调控,氢酶和固氮酶是其中最为重要的两种酶,利用诱变和遗传工程技术对光合细菌的氢酶和固氮酶进行改造,构建氢酶缺失或是固氮酶高倍表达的高效产氢菌株,对于提高光合细菌产氢效率具有重要意义。Kern 等获得了 *R. rubrum* 吸氢酶缺失菌株,能使以 50 mmol/L 的乳酸盐和 7 mmol/L 的谷氨酸钠为底物产氢的转化效率提高 30%^[29]。Yoshino 等通过插入干扰 *hupL* 基因构建了一株吸氢酶缺失的变异株 ($\Delta hupL$),该菌株产氢率是野生菌株的 3 倍^[30]。Masukawa 等发现在最佳产氢条件下 *Anabaena* 吸氢酶缺失 (*hoxL*⁻) 变异株的产氢效率达到野生菌株的 4 ~ 7 倍^[31]。通过失活 various *R. capsulatus* 的吸氢酶活性其产氢效率会得到很大的提高^[32]。此外,利用遗传技术手段构建耐氧性产氢酶,提高产氢酶对氧气等不利环境的耐受能力,利用基因手段实现对产氢相关酶和代谢过程中关键酶的调控,利用代谢工程手段对光合细菌产氢过程中的代谢过程进行调节,可以有效地提高产氢效率,目前这些方面的研究在生物制氢领域还没有展开,值得深入研究。

2.3 光合系统的改造和调控

光合细菌光照条件下生长和产氢所需的 ATP 都是由光合磷酸化提供的,光照的形式以及强度对光合细菌的产氢具有显著影响,对光合反应器的研制也具有直接的指导意义。目前光合细菌制氢反应器多采用人工光源,能耗高,效率低,而太阳光源又太分散,难以满足规模化制氢的需要,通过遗传技术或诱变手段获得光合系统改进的突变株,降低光合细菌生长和产氢过程中对光的依赖性,选育具有光依赖性低产氢效率高的高效生产菌株是未来光合产氢育种方面发展的一个重要方向。Kondo 等分离得到了一株 *R. sphaeroides* 的 *Rv* 突变株,在 350 ~ 1 000 nm 波长范围内吸收的光比野生菌株少,其色素含量也比野生菌株的少,其产氢量比野生菌株提高了 50%^[33],Melis 也发现减少绿藻中叶绿素的含量其光合效率也会有较大提高^[34]。已有的研究表明对光合系统改造可以有效降低光合产氢过程中的光依赖性,提高产氢效率,但目前关于光合细菌光合系统改造的研究还仅局限于实验室阶段,通过现代生物技术手段获得光合系统改进的突变株,降低光合细菌生长和产氢过程中对光的依赖性,选育具有

光依赖性低产氢效率高的菌株,尤其是适用于工程化应用的高效生产菌株是未来光合产氢育种方面发展的一个重要方向。

2.4 多菌种混合产氢研究

靠单一菌实现规模化制氢是非常困难的,因为很多生物过程需要靠几种或多种菌种的协同作用。采用多菌种联合制氢不仅可以提高制氢效率,使反应物得到彻底的分解,还能提高氢气的产量,生物制氢的微生物混合培养或混合发酵已越来越受到人们的重视。张立宏的研究表明:混合菌种比纯菌种的光合细菌表现出更高的产氢能力和更高的稳定性,且混合菌种较单一菌种的产氢条件更宽松^[35]。刘颖等研究发现,光合细菌光发酵和厌氧细菌暗发酵联合制氢能够大大地增加细菌的制氢能力,提高底物的利用率^[36]。Oashima等利用*Rb. capsulata*野生型和吸氢酶缺陷变异菌株分别和纤维素降解菌ATCC21399共培养进行纤维素产氢实验,研究结果表明:变异菌株的产氢量要高于野生菌株的产氢量^[37]。Chi Mei Lee等研究表明当使用不同厌氧发酵反应器的反应液进行光合产氢时,发酵液不需要再进行预处理就能很好地被光合微生物利用^[38]。目前,在生物制氢过程中多采用将厌氧制氢和光合生物制氢分开的方式进行联合产氢,即先利用厌氧细菌较强的基质降解能力将产氢底物分解到有机酸水平,然后再进入光合生物制氢阶段,由光合细菌进一步利用小分子有机酸产生氢气,从而显著提高原料的利用率。然而联合产氢过程中仍存在着菌种之间的相互抑制,如发酵末端产物对细菌的反馈抑制,以及厌氧细菌发酵产氢后发酵液的进一步处理等问题,这些都需要在后续研究过程中予以解决。由于光合细菌和厌氧细菌都属于厌氧产氢,将两种细菌在同一反应器内进行混合培养产氢,不仅可以综合利用两者的产氢优势,提高生物制氢效率,而且可以简化制氢反应器设计,显著降低反应器体积,减少产氢工艺流程,是一种非常有发展前景的混合生物制氢方式,在国内外还未见相关的报道,值得深入研究。

3 高效光合生物制氢反应器的研制

光合制氢反应器的研制也是提高光合制氢效率的重要内容,由于光合细菌生物制氢技术的研究起步较晚,目前各种类型光合细菌制氢反应器的研究还处于初级探索阶段,其研究水平和规模还基本局限在实验室水平^[39]。光合制氢反应器根据其光源的分布情况可分为内置光源和外置光源两种结构形式,根据结构不同又可分为管式、板式、箱式、柱式、

螺旋式和浮床式等。1950年Cook研制出第1台垂直管状光生物反应器,随后其他形式的光生物制氢反应器相继问世,Torzillo等研制了采用有机玻璃制成的蛇形管式光生物反应器,可以平铺在地面,同时他们研制的双层排列管式光生物反应器使得光转化率达到了7.95%^[40]。Bernado等研制的以光合细菌中的绿细菌作为产氢菌的横板式反应器,其光源放置在两横板之间,提高了光能利用率^[41]。Chi Mei Lee等研制的多柱回流式光合制氢反应器,因配置磁力搅拌和料液回流装置,大大提高了料液处理能力和产气率^[42],Kaushik Nath等研制的夹层柱状光合细菌制氢反应器采用了夹层水套结构,从而有效地控制了反应器中料液的温度。周汝雁等研制的环流罐式光合制氢反应器利用反应液的循环流动实现了基质与光合细菌的均匀混合以及反应液的温度控制,缩小了体积,降低了反应器的生产成本。张全国等研制出多种内置光源的光合生物制氢反应器,太阳光为主光源并辅助人工冷光源,以及内置光纤的联合使用很好地解决了反应液深层供光的问题,也降低了反应器的运行成本,同时折流板式的设计也提高了反应器的光能利用率^[12]。

虽然目前国内外学者对光合细菌制氢的研究给予了较高的重视,但受多种因素的影响,光合细菌制氢反应器在实际生产中还存在诸多问题,如反应器的结构形式设计、低能耗光源选择、反应器色素吸附、温度调节及运行成本控制等,这是当前光合生物制氢反应器研制中的主要技术障碍。光合细菌产氢反应器的研制作为光合生物制氢技术由实验室向生产实际转化的必经阶段已成为当前研究的热点。

4 展望

随着生物与工程技术的发展以及各种先进检测技术的相继出现,随着基因工程和分子育种技术在光合制氢上应用的不断深入及影响光合生物制氢技术发展制约因素的不断克服,未来光合生物制氢技术的研究也必将步入一个全新的时代。

4.1 光合细菌产氢调控机理的研究

光合细菌产氢过程中光合作用、固氮作用、碳代谢、氢代谢以及相关酶的催化作用等并不是相互独立工作的,而是相互协调控制。研究不同功能之间是如何进行协调发挥作用的,各个功能是如何对外界环境的变化做出响应的,以及酶的空间结构、催化作用、基因序列等问题都有很高的理论价值。深入探讨光合细菌产氢机理,对于定向改进光合细菌的光合作用及相关酶的产氢催化作用,实现生物制氢产业化生产,具有很高的指导意义。

4.2 分子育种技术在光合制氢中的应用

在使用经典遗传学方法诱变、筛选高产菌种的同时,更重要的是利用现代分子生物学技术从细胞乃至分子水平上对产氢菌株进行改造,例如通过基因重组的方法构建基因工程菌或通过基因修饰的方式提高目的菌株的产氢能力。利用遗传工程技术改造产氢菌株,构建多功能基因工程菌,选育 *nif* 基因多拷贝的菌株或是通过遗传技术或诱变手段获得光合系统改进的突变株,选育具有光敏感性强和产氢效率高的高效生产菌株是未来光合产氢育种方面发展的一个重要方向。运用代谢工程等现代生物技术手段对光合细菌产氢的代谢途径进行改造也可以有效地提高产氢效率,目前该方面的研究在生物制氢

领域还刚刚起步,值得深入研究。

4.3 光合细菌生物制氢产业化应用

光合细菌生物制氢技术在国内已经有广泛研究,其潜在价值和意义已经得到人们的广泛共识,在许多方面取得了突破性的进展,但生物制氢的工业化应用仍然存在很大的技术壁垒,制氢效率低、成本高一直制约着光合生物制氢的进一步发展及应用。高效稳定产氢菌种的构建,现代生物与工程技术手段的应用,高效低能耗光合生物反应器的研制以及利用有机废弃物等多原料发酵产氢等问题上还需要展开多方位的研究,以进一步提高光合生物制氢效率,降低制氢成本,使其在商业上更具竞争力。

参 考 文 献

- Ronevich J A, Speer J G, Krauss G, et al. Improvement of the hydrogen microprint technique on AHSS steels[J]. *Metallography, Microstructure, and Analysis*, 2012, 1(2): 79 ~ 84.
- Wang C C, Chang C W, Chu C P, et al. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 102(1): 83 ~ 92.
- Ronevich J A, De Cooman B C, Speer J G, et al. Hydrogen effects in prestrained transformation induced plasticity steel[J]. *Metallurgical and Materials Transactions A*, 2012, 43(7): 2 293 ~ 2 301.
- 杨素萍, 曲音波. 光合细菌生物制氢[J]. *现代化工*, 2003, 23(9): 17 ~ 22.
Yang Suping, Qu Yinbo. Hydrogen production using photosynthetic bacteria[J]. *Modern Chemical Industry*, 2003, 23(9): 17 ~ 22. (in Chinese)
- 张全国, 王素兰, 尤希凤. 光合菌群产氢量影响因素的研究[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(10): 182 ~ 185.
Zhang Quanguo, Wang Sulan, You Xifeng. Effects of the influencing factors of photosynthetic bacteria group on hydrogen production [J]. *Transactions of the CSAE*, 2006, 22(10): 182 ~ 185. (in Chinese)
- 计红芳, 陈锡时, 王爱杰. 光合细菌光合产氢的研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2002, 22(5): 44 ~ 60.
Ji Hongfang, Chen Xishi, Wang Aijie. Advance in photosynthetic production of hydrogen by photosynthetic bacteria[J]. *Journal of Microbiology*, 2002, 22(5): 44 ~ 60. (in Chinese)
- 朱核光, 赵琦琳, 史家梁. 光合细菌 *Rhodospseudomonas* 产氢的影响因子实验研究[J]. *应用生态学报*, 1997, 8(2): 194 ~ 198.
Zhu Huguang, Zhao Qilin, Shi Jiali. Study on influence factors of hydrogen production by *Rhodospseudomonas* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1997, 8(2): 194 ~ 198. (in Chinese)
- Turkarlan S, Yigit D O, Aslan K, et al. Photobiological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O. U. 001 by utilization of waste water from milk industry [M] // Zaborosky O R. *Biohydrogen*, London: Plentm Press, 1998: 151 ~ 156.
- Fascetti E D, Addario E, Todini O, et al. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1998, 23(9): 753 ~ 760.
- 张军合, 张全国, 师玉忠, 等. 光合细菌高效产氢菌群在猪粪污水中产氢量的研究[J]. *河南农业大学学报*, 2006, 40(2): 177 ~ 180.
Zhang Junhe, Zhang Quanguo, Shi Yuzhong, et al. Study on hydrogen production by high effect hydrogen production PSB group with pig dejecta as substrate[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2006, 40(2): 177 ~ 180. (in Chinese)
- Singh S P, Srivastava S C, Pandey K D. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugar cane juice and whey [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1994, 19(5): 437 ~ 440.
- 李刚. 5 m³ 太阳能光合细菌连续制氢试验系统研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
- 张全国, 雷廷富, 尤希凤, 等. 影响天然混合红螺菌产氢因素的实验研究[J]. *太阳能学报*, 2005, 26(2): 248 ~ 252.
Zhang Quanguo, Lei Tingzhou, You Xifeng, et al. Study on hydrogen production influence factor[J]. *Acta Energal Solaris Sinica*, 2005, 26(2): 248 ~ 252. (in Chinese)
- 岳建芝, 李刚, 张全国, 等. 促进木质纤维素类生物质酶解的预处理技术综述[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(3): 340 ~ 343.
Yue Jianzhi, Li Gang, Zhang Quanguo, et al. Overview on pretreatment technology about promoting the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic with biomass[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, 39(3): 340 ~ 343. (in Chinese)
- 杨素萍, 曲音波. 光合细菌生物制氢[J]. *现代化工*, 2003, 23(9): 17 ~ 22.
Yang Suping, Qu Yinbo. Hydrogen production using photosynthetic bacteria[J]. *Modern Chemical Industry*, 2003, 23(9): 17 ~ 22. (in Chinese)

- 16 张全国,师玉忠,张军合,等. 太阳光谱对光合细菌生长及产氢特性的影响研究[J]. 太阳能学报,2007,28(10):1 135 ~ 1 139.
Zhang Quanguo, Shi Yuzhong, Zhang Junhe, et al. Influence of solar spectrum on charactersitics of growth and hydrogen production of photosynthetic bacteria[J]. Acta Energiæ Solaris Sinica, 2007, 28(10): 1 135 ~ 1 139. (in Chinese)
- 17 Miyake J, Kawamura S. Efficiency of light energy conversion to hydrogen by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 1987, 12(3):147 ~ 149.
- 18 孙琦,徐向阳,焦杨文. 光合细菌产氢条件的研究[J]. 微生物学报,1995,35(1): 65 ~ 73.
Sun Qi, Xu Xiangyang, Jiao Yangwen. The study on hydrogen production conditions with photosynthetic bacteria [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1995, 35(1): 65 ~ 73. (in Chinese)
- 19 王素兰,张全国,周雪花. 光合生物制氢过程中系统温度变化实验研究[J]. 太阳能学报,2007,28(11):1 253 ~ 1 255.
- 20 Postgate J R. The fundamentals of nitrogen fixation[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.
- 21 王友绍,李季伦. 固氮酶催化机制及化学模拟生物固氮研究进展[J]. 自然科学进展:国家重点实验室通讯,2000,10(6): 481 ~ 490.
- 22 Madden M S, Ludden P W, Paustian T D, et al. Effects of homocitrate, homocitrate lactone, and fluorohomocitrate on nitrogenase in NifV-mutants of *Azotobacter vinelandii* [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(17): 5 403 ~ 5 405. (in Chinese)
- 23 Scolnik P A, Virosco J, Haselkorn R. The wild-type gene for glutamine synthetase restores ammonia control of nitrogen fixation to Gln- (glnA) mutants of *Rhodospseudomonas capsulata* [J]. Journal of Bacteriology, 1983, 155(1): 180 ~ 185.
- 24 Tadashi Matsunaga, Tomoyuki Hatano, Akiyo Yamada. Microaerobic hydrogen production by photosynthetic bacteria in a dlublephase photobioreactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 68(6): 20 ~ 24.
- 25 Zhu H, Ueda S, Asada Y, et al. Hydrogen production as a novel of wastewater treatment-studies on tofu wastewater with entrapped *R. sphaeroides* and mutagenesis [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27(11 ~ 12): 1 349 ~ 1 357.
- 26 尤希凤. 光合产氢菌群的筛选及其利用猪粪污水产氢因素的研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2005.
- 27 Menisher T, Metghalchi M, Cutoff E B. Mixing studies in bioreactors [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2000, 22(2): 115 ~ 120.
- 28 韩滨旭. 光合产氢细菌的分离鉴定及其产氢特性分析[D]. 郑州:河南农业大学, 2011.
- 29 Kern M, Klipp W, Klemme J H. Increased nitrogenase dependent H₂ production by hup mutants of *Rhodospirillum rubrum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 1 768 ~ 1 774.
- 30 Yoshino F, Ikeda H, Masukawa H, et al. High photobiological hydrogen production activity of a *Nostoc* sp. PCC 7422 uptake hydrogenase-deficient mutant with high nitrogenase activity [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(1): 101 ~ 112.
- 31 Masukawa H, Mochimaru M, Sakurai H. Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not the bidirectional hydrogenase gene, lead to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(5): 618 ~ 624.
- 32 Ozturk Y, Yucel M, Daldal F, et al. Hydrogen production by using *Rhodobacter capsulatus* mutants with genetically modified electron transfer chains [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31(11): 1 545 ~ 1 552.
- 33 Kondo T, Arakawa M, Hirai T, et al. Enhancement of hydrogen by a photosynthetic bacterium mutants with redcent pigment [J]. Journal of Bioengineer, 2002, 93(2): 145 ~ 150.
- 34 Melis A, Neidhardt J. Biohydrogen [M]. London: Plemum Press, 1998: 2 536 ~ 2 573.
- 35 张立宏. 混合菌种生物技术(MCB)光合产氢的实验研究[D]. 杭州:浙江大学, 2008.
- 36 刘颖,王爱杰,邓嫫,等. 联合生物制氢方法及发展趋势[J]. 生物加工过程, 2007, 5(3): 6 ~ 9.
Liu Ying, Wang Aijie, Deng Xian, et al. Development of integrated biological hydrogen production technology and its trends [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2007, 5(3): 6 ~ 9. (in Chinese)
- 37 Oashima H, Takakuwa S, Katsuda T. Production of hydrogen by a hydrogenase-dificient mutants of *Rhodobacter capsulatus* [J]. Journal of Fermentation Bioengineering, 1998, 85(5): 470 ~ 475.
- 38 Chi Mei Lee, Pei-Chung Chen, Chun-Chin Wang, et al. Photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent [J]. International Jouranal Hydrogen Energy, 2002, 27(11 ~ 12): 1 309 ~ 1 313.
- 39 王昶,贾士儒,贾庆竹,等. 光合细菌生物制氢技术[J]. 生物加工过程. 2005, 3(4): 9 ~ 13.
Wang Chang, Jia Shiru, Jia Qingzhu, et al. Technology of hydrogen production by photosynthetic bacteria [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2005, 3(4): 9 ~ 13. (in Chinese)
- 40 Torzillo G, Pushparaj B, Bocci F, et al. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors [J]. Biomass, 1986, 11(1): 61 ~ 74.
- 41 Bernado Ruggeri. Bio-routes to hydrogen production [R/OL]. A Winter School on State of Art & Future of "Hydrogen & Fuel Cell Technologies". bardonecchia, 2007. http://www.flamesofc.org/public/hyschool-bardonecchia/presentations/15_Ruggeri.pdf.
- 42 Chi Mei Lee, Kuo Tsang Hung. Hydrogen production using *Rhodospseudomonas palustris* WP 3-5 with hydrogen fermentation reactor effluent [C] // 16th World Hydrogen Energy Conference (WHEC 16). Lyon, France, 2006.
- 43 Kim M S, Moon K W, Lee S K. Hydrogen production from food processing waste water and sewage sludge by anaerobic dark fermentation combined with photofermentation [M] // Miyake J. Biohydrogen II. Amsterdam, Elsevier, 2001: 263 ~ 272.